

食品中動物用藥殘留量檢驗方法－乃託文之檢驗(二)

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Nitrovin (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜水產品之肌肉、內臟、乳汁、蛋、蜂蜜及脂肪中乃託文(nitrovin)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及淨化後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：CORTECS C18，2.7 μm ，2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達5000 $\times g$ 以上，且溫度控制可達10 $^{\circ}\text{C}$ 以下者。
 - 2.1.6. 高速分散裝置(High speed dispersing device)：SPEX SamplePrep 2010 GenoGrinder[®]，1000 rpm以上，或同級品。
 - 2.1.7. 超音波振盪器(Ultrasonicator)，溫度控制可達50 $^{\circ}\text{C}$ 以上者。
 - 2.1.8. 氮氣蒸發裝置(Nitrogen evaporator)。
 - 2.2. 試藥：乙腈、甲醇、乙酸乙酯及正己烷均採用液相層析級；甲酸、二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、無水硫酸鎂及氯化鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 M $\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；乃託文對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 萃取用粉劑^(註)：含無水硫酸鎂6 g及氯化鈉1.5 g。
註：可依需求自行評估使用市售各種萃取用組合套組。
 - 2.3.3. 陶瓷均質石(Ceramic homogenizer)：Bond Elut QuEChERS P/N 5982-9313，或同級品。
 - 2.3.4. 容量瓶：50 mL。
 - 2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.4. 試劑之調製：

- 2.4.1. 含1%甲酸之乙腈溶液：
取乙腈與甲酸以99：1 (v/v)比例混勻。
- 2.4.2. 含1%甲酸之乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液：
取含1%甲酸之乙腈溶液與甲醇以95：5 (v/v)比例混勻。
- 2.4.3. 乙腈:乙酸乙酯(4:1, v/v)溶液：
取乙腈與乙酸乙酯以4：1 (v/v)比例混勻。
- 2.4.4. 50%乙腈溶液：
取乙腈50 mL，加去離子水使成100 mL。
- 2.4.5. 乙腈飽和之正己烷溶液：
取正己烷500 mL，加入乙腈50 mL，振盪混勻後，靜置至完全分層後，取正己烷層。
- 2.5. 移動相溶液之調製：
- 2.5.1. 移動相溶液A：
取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
- 2.5.2. 移動相溶液B：
取甲酸1 mL，加甲醇使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。
- 2.6. 標準溶液之配製：
取乃託文對照用標準品約5 mg，精確確定，以DMSO溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時取適量標準原液，以甲醇稀釋至100 ng/mL，供作標準溶液。
- 2.7. 檢液之調製：
- 2.7.1 肌肉、內臟、蛋、蜂蜜及乳汁
將肌肉及內臟檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定；蛋類檢體去除外殼後，將蛋白與蛋黃混勻，取約2 g，精確稱定；蜂蜜檢體混勻，取約2 g，精確稱定；乳汁檢體混勻後，精確量取2 mL，置於50 mL離心管中，加入陶瓷均質石1顆及預冷之去離子水10 mL，靜置10分鐘。再加入含1%甲酸之乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液5 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，加入萃取用粉劑，並蓋上離心管蓋，隨即激烈振盪數次，防止鹽類結塊，再以高速分散裝置於1000 rpm振盪或以手激烈振盪1分鐘，於10°C以5000 ×g離心1分鐘，取上清液。殘留物再加入

含1%甲酸之乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液5 mL，蓋上離心管蓋。旋渦混合1分鐘，重複上述步驟1次，合併上清液，作為檢液原液。取檢液原液500 μ L (a)，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物再以50%乙腈溶液溶解並定容至1 mL (b)，加入乙腈飽和之正己烷溶液1 mL，振盪1分鐘，於10°C以5000 $\times$ g離心1分鐘，取下層液，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.7.2 脂肪

將檢體細切均質後，取約2 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入陶瓷均質石1顆及乙腈：乙酸乙酯(4:1, v/v)溶液10 mL，蓋上離心管蓋，旋渦混合1分鐘，於50°C超音波振盪15分鐘，再於10°C以5000 $\times$ g離心1分鐘，取上清液作為檢液原液。取檢液原液500 μ L (a)，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物再以50%乙腈溶液溶解並定容至1 mL (b)，加入乙腈飽和之正己烷溶液1 mL，振盪1分鐘，於10°C以5000 $\times$ g離心1分鐘，取下層液，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 基質匹配檢量線之製作：

取空白檢體，依2.7.節調製空白檢液原液，取空白檢液原液5 mL，於40°C水浴中以氮氣吹至微乾，殘留物以50%乙腈溶液溶解並定容至5 mL，取500 μ L，分別加入標準溶液1~100 μ L及50%乙腈溶液，使體積為1000 μ L，混合均勻，加入乙腈飽和之正己烷溶液1 mL，振盪1分鐘，於10°C以5000 $\times$ g離心1分鐘，取下層液，經濾膜過濾後，供作基質匹配檢量線溶液，並依下列條件進行液相層析串聯質譜分析。就乃託文之波峰面積，與對應之乃託文濃度，製作0.1~10 ng/mL之基質匹配檢量線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：CORTECS C18，2.7 μ m，2.1 mm $\times$ 10 cm。

層析管溫度：40°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 $\rightarrow$ 1.0	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20
1.0 $\rightarrow$ 5.0	80 $\rightarrow$ 0	20 $\rightarrow$ 100
5.0 $\rightarrow$ 10.0	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100
10.0 $\rightarrow$ 10.5	0 $\rightarrow$ 80	100 $\rightarrow$ 20
10.5 $\rightarrow$ 13.5	80 $\rightarrow$ 80	20 $\rightarrow$ 20

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 µL。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：5.5 kV。

離子化模式：ESI正離子。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：500°C。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：50 psi。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：High。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。

偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
乃託文	361 > 222*	200	27
(Nitrovin)	361 > 302	200	29

*定量離子對。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及基質匹配檢量線溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件進行分析，就檢液與基質匹配檢量線溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中乃託文之含量(ppm)：

$$\text{檢體中乃託文之含量(ppm)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由基質匹配檢量線求得檢液中乃託文之濃度(ng/mL)

V：萃取檢體之含1%甲酸之乙腈：甲醇(95:5, v/v)溶液體積或
乙腈：乙酸乙酯(4:1, v/v)溶液體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g或mL)

F：稀釋倍數，由b/a求得

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.001 ppm。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Tao, Y., Yu, H., Chen, D., Liu, Z. Y., Yang, D., Pan, Y., Wang, Y., Huang, L. and Yuan, Z. 2010. Determination of sodium nifurstyrenate and nitrovin residues in edible food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after ultrasound-assisted extraction. J. Chromatogr. B 878: 3415-3420.